ПАРАЗИТОЛОГИЯ, X, 3, 1976

УДК 576.895.132 : 576.8.095.18

ИЗУЧЕНИЕ ИНГИБИТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ ФЕНОТИАЗИНА НА ОБМЕН УГЛЕВОДОВ У MECISTOCIRRUS DIGITATUS (NEMATODA; RHABDITIDA)

Э. А. Шестак

Биолого-почвенный институт Дальневосточного научного центра
АН СССР, Владивосток

Введение фенотиазина в среду инкубации *M. digitatus* имело следующий эффект: увеличивались расщепление гликогепа и выделение молочной кислоты в аэробных условиях, увеличивалось выделение уксусной и уменьшалось выделение α-метилмасляной кислот, при инкубации гомогенатов и гиалоплазмы с глюкозой интенсивность гликолиза снижалась.

Известно, что для понимания механизма действия антгельминтиков большое значение имеет знание основных биохимических процессов, протекающих в тканях гельминтов. Поскольку при мецистоциррозе предложена дегельминтизация животных фенотиазином (Ивашкин, 1948; Городович, 1968), интересно было проверить влияние фенотиазина на углеводный обмен мецистоциррусов. Лечебно-профилактические свойства фенотиазина, который в настоящее время широко применяется для дегельминтизации и химиопрофилактики гельминтозов, изучены обстоятельно. Фенотиазин эффективен при стронгилозах, трихостронгилидозах и трихонематодозах лошадей. Ценность фенотиазина заключается еще и в том, что он задерживает развитие яиц и личинок отдельных гельминтов (Антипин и др., 1959). Механизм действия фенотиазина практически не изучен. Мы нашли только работы Вайерлинга (Vierling, 1970) и Антипина с сотрудниками (1959), которые считают, что фенотиазин угнетает расщепление гельминтами гликогена, а также ряд других ферментативных реакций, проникая во внутрь тела гельминтов через кутикулу и половое отверстие. Целью нашей работы было изучение действия фенотиазина на гликолиз нематоды *Mecistocirrus digitatus.*

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом нашего исследования была нематода *Mecistocirrus digitatus* из отряда *Rhabditida*. Мецистоциррусов выбирали на бойне из сычугов крупного рогатого скота, промывали физиологическим раствором, подсушивали между листами фильтровальной бумаги. Инкубацию гельминтов и определение конечных продуктов углеводного обмена проводили по описанной ранее методике (Шестак, Выхрестюк, 1972). Фенотиазин практически не растворяется в воде и водных растворах, поэтому мы насыщали фенотиазином среду Рингера, подогревая ее до 50° при помешивании, а потом фильтровали и в этой среде инкубировали гельминтов. Концентрация фенотиазина в пробах равнялась 10^{-10} М. Количество углеводов в среде до и после инкубации и количество гликогена в теле гельминтов до и после инкубации определяли методом Морриса (Morris, 1948). Содержание летучих жирных кислот в гомогенатах и гиалоплазме из мецистоциррусов определяли следующим образом: три миллилитра пробы, содержащей 0.5 мл $6 \cdot 10^{-2}$ М раствора глюкозы, 1.5 мл биологического материала и 1 мл фосфатного буфера с АТФ или без него инкубировали на водяной бане при 30° в течение 30 мин. После инкубации содержимое пробы доводили дистиллированной водой до 100 мл и отгоняли с водяным паром. Контролем служила проба, содержащая в 100 мл воды 1.5 мл биологического материала.

Интенсивность процесса гликолиза в гомогенатах и гиалоплазме с глюкозой и фруктозодифосфатом (ФДФ) в качестве субстрата изучали по методике, описанной Сенутайте (1970). Об интенсивности процесса гликолиза судили по приросту конечного продукта — молочной кислоты. Молочную кислоту определяли колориметрическим методом с параоксидифенилом, по Баркеру и Саммерсону (Barker a. Summerson, 1941). Повторность опытов восьмикратная.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание гликогена в тканях мецистоциррусов до и после инкубации в среде с фенотиазином в течение суток представлено в табл. 1. При инкубации гельминтов в течение 24 час. в среде с антгельминтиком показано, что фенотиазин увеличивает расщепление гликогена, особенно в аэробных условиях. Присутствие глюкозы в среде инкубации не влияло на изменение количества гликогена. В условиях наших опытов глюкоза гельминтом не потреблялась ни в одной серии опытов. Не потребляли мецистоциррусы и другие углеводы: галактозу, мальтозу, сорбозу, лактозу и сахарозу. Это может быть объяснено отсутствием щелочной фосфатазы в тканях и кутикуле мецистоциррусов (Клочкова, Выхрестюк, 1972), но количество резервных полисахаридов тканей, разложенных за сутки, было велико. По-видимому, мецистоциррусы используют при голодании резервные полисахариды тканей. Высокое потребление гликогена нематодами при голодании показано и другими авторами (Brand, 1934; Pandya, 1961; Savel a. Georges, 1969; Van den Bossche et al., 1969).

Таблица 1

Содержание гликогена в тканях мецистоциррусов (в мг/г)

Условия опыта (по 12 опытов)	Исходное количество	После инкубации	
		с глюкозой	с глюкозой и фенотиазином
Аэробные	52.7±1.1	18.74±1.35	6.0±0.7
Анаэробные	52.7±1.1 *	9.52±0.74	7.8±0.9

* Контроль один для двух серий.

После 24-часовой инкубации определяли количество выделившейся молочной кислоты. В контрольных опытах без фенотиазина при содержании в аэробных условиях выделялось 2.52±0.22 мкмоля/г/сутки молочной кислоты, в анаэробных условиях — 2.82±0.20. В пробах с добавлением фенотиазина в аэробных условиях выделялось 3.36±0.20, в анаэробных условиях — 3.02±0.19 мкмоль/г/сутки молочной кислоты. Достоверность различия между пробами без введения и с введением фенотиазина в аэробных условиях составляла 99.8, а в анаэробных — 95%. Количество выделившейся молочной кислоты в разных сериях опытов согласуется с данными по потреблению гликогена. Присутствие фенотиазина в среде инкубации увеличивало выделение молочной кислоты. Наши данные не согласуются с точкой зрения некоторых авторов (Мозгов, 1954; Антипин и др., 1959), утверждавших, что этот антгельминтик угнетает расщепление гликогена. Расхождение, видимо, связано с тем, что эти авторы изучали других гельминтов (гемонхусов, диктиокаул).

Как известно, для паразитических нематод нехарактерно расщепление углеводов до углекислого газа и воды. У них углеводы в основном превращаются в летучие жирные кислоты. В условиях наших опытов без фенотиазина мецистоциррусы выделяли в среду инкубации уксусную, пропионовую и α-метилмасляную кислоты, причем в аэробных условиях выделялось больше α-метилмасляной кислоты (40.4%), меньше уксусной (33.9%) и еще меньше пропионовой (25.65%). В анаэробных условиях наблюдалась другая закономерность: больше всего выделялось уксусной кислоты (50.9%), меньше — пропионовой (35.5%) и еще меньше α-метилмасляной (13.65%) (Шестак, Выхрестюк, 1972). В опытах с введением фенотиазина наблюдалась другая картина (табл. 2). Сравнивая результаты этих опытов, можно сделать вывод, что присутствие фенотиазина в среде инкубации стимулирует выделение уксусной кислоты и сильно угнетает выделение α-метилмасляной.

Таблица 2

Летучие жирные кислоты, выделяемые мецистоциррусами в среду инкубации

Выделенная кислота	Аэробные условия		Анаэробные условия	
	в %	в мкмолях/г/24 ч.	в %	в мкмолях/г/24 ч.
Уксусная	62.21 (33.90)	3.10±0.02 (1.32±0.03)	62.83 (50.90)	3.13±0.01 (2.53±0.02)
Пропионовая	32.87 (25.70)	1.42±0.03 (1.12±0.02)	31.55 (35.50)	1.37±0.01 (1.55±0.02)
α-Метилмасляная	4.92 (40.40)	0.19±0.01 (1.57±0.01)	5.62 (13.60)	0.22±0.01 (0.53±0.01)

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4 в скобках приведены данные без добавления антгельминтика.

Итак, анализируя действие фенотиазина на углеводный обмен целых мецистоциррусов, можно сказать, что присутствие фенотиазина в среде инкубации увеличивает расщепление гликогена в аэробных условиях в 3 раза. Фенотиазин увеличивает выделение уксусной кислоты в аэробных условиях и уменьшает выделение α-метилмасляной.

Действие фенотиазина на интенсивность гликолиза в гомогенатах и гиалоплазме из мецистоциррусов. Влияние фенотиазина на интенсивность процесса гликолиза изучали как с гомогенатами тканей, так и с гиалоплазмой. Об интенсивности процесса судили по приросту конечного продукта — молочной кислоты. В качестве субстрата использовали глюкозу. Как и целые гельминты, гомогенат и гиалоплазма из мецистоциррусов, очевидно, не разлагают глюкозу: во всяком случае, количество молочной кислоты в пробе не возрастало. Однако выделение молочной кислоты значительно повышалось и в гомогенате и в гиалоплазме при добавлении АТФ (табл. 3). Сравнивая эти данные, можно сказать, что фенотиазин угнетает процесс гликолиза в гомогенатах тканей и гиалоплазме при инкубации с глюкозой, но незначительно. Фтористый натрий и иодацетат в концентрации $3 \cdot 10^{-3}$ М снижают выделение молочной кислоты в гиалоплазме больше, чем в гомогенатах тканей.

Аналогичные опыты были поставлены с ФДФ в качестве субстрата (табл. 4). При добавлении пирувата ($3 \cdot 10^{-3}$М) и креатина ($3 \cdot 10^{-3}$ М) в инкубационные пробы интенсивность гликолиза увеличивалась, биосинтез молочной кислоты в гомогенатах был в 3.5, в гиалоплазме — в 3 раза выше, чем в пробах с одним ФДФ. При введении в среду инкубации классических ингибиторов гликолиза (фтористого натрия и иодацетата) интенсивность гликолиза изменялась, но не существенно. Сравни-

Таблица 3

Интенсивность образования молочной кислоты при инкубации с глюкозой и влияние ингибиторов

Вариант опыта	Количество образовавшейся молочной кислоты (в мкмолях/мл/30 мин.)	
	гомогенат	гиалоплазма
Глюкоза	Лактат не накапливался	
Глюкоза+АТФ+фенотиазин	261.70±8.25 (298.65±29.25)	222.75±9.25 (280.00±0.82)
Глюкоза+АТФ+фенотиазин+NaF	175.90±28.10 (185.40±22.55)	112.75±2.75 (132.00±4.40)
Глюкоза+АТФ+фенотиазин+йодацетат	169.40±3.30 (179.90±3.92)	119.80±2.20 (126.00±3.85)

вая данные табл. 4, можно сказать, что антгельминтик почти никакого влияния не оказывает на интенсивность гликолиза в гомогенатах и гиалоплазме из тканей мецистоциррусов.

Таблица 4

Интенсивность образования молочной кислоты в гомогенатах и гиалоплазме из мецистоциррусов при инкубации с ФДФ

Вариант опыта	Количество образовавшейся молочной кислоты (в мкмолях/мл/30 мин.)	
	в гомогенатах	гиалоплазма
С ФДФ	147.5±8.7	140.0±11.8
С ФДФ+фенотиазин	143.8±2.4	127.9±4.1
С ФДФ+фенотиазин+пируват+креатин	500.0±5.5 (512.2±3.9)	395.6±5.3 (414.7±2.3)
С ФДФ+фенотиазин+NaF	117.8±3.8 (136.5±7.4)	129.8±3.7 (140.0±2.6)
С ФДФ+фенотиазин+иодацетат	159.9±4.0 (171.2±1.2)	119.5±1.5 (128.2±3.0)
С ФДФ+фенотиазин+пируват+креатин+NaF	502.8±4.2 (511.2±1.8)	423.3±2.7 (435.6±4.7)
С ФДФ+фенотиазин+пируват+креатин+иодацетат	363.0±4.0 (369.2±3.8)	349.0±1.6 (360.8±4.7)

При инкубации с глюкозой гомогенатов и гиалоплазмы из мецистоциррусов нам удалось показать наличие в тканях мецистоциррусов уксусной, пропионовой, α-метилмасляной, н-валериановой, α-метилвалериановой и н-капроновой кислот. После 30-минутной инкубации гомогенатов и гиалоплазмы с глюкозой состав летучих жирных кислот изменялся, к перечисленным выше кислотам добавлялась изокапроновая кислота. Добавление в среду АТФ не изменяло качественный состав летучих жирных кислот. Добавление в среду инкубации фенотиазина не влияло на качественный состав летучих жирных кислот.

Таким образом, состав летучих жирных кислот в тканях мецистоциррусов довольно разнообразен, включает как нормальные (н-C_5, н-C_6), так и разветвленные кислоты, которые содержатся в большем количестве и представлены α-Me-C_4, α-Me-C_5 и изо-C_6-кислотами. Эти летучие жирные кислоты близки по своему количеству и соотношению к кислотам, выделяемым другими гельминтами-анаэробами желудочно-кишечного тракта (аскаридами).

ВЫВОДЫ

1. Присутствие фенотиазина в среде инкубации увеличивало расщепление гликогена в аэробных условиях. Молочной кислоты в присутствии фенотиазина выделялось в аэробных условиях на 33, а в анаэробных —

на 7% больше по сравнению с пробами без антгельминтика. Фенотиазин увеличивал выделение уксусной кислоты в аэробных условиях на 28%, а в анаэробных — на 12%. Выделение α-метилмасляной кислоты уменьшалось в аэробных условиях на 35, в анаэробных — на 8%.

2. Фенотиазин угнетал процесс гликолиза в гомогенатах и гиалоплазме при инкубации с глюкозой, но незначительно; а при инкубации с ФДФ антгельминтик не оказывал почти никакого влияния на интенсивность гликолиза.

Литература

Антипин Д. Н., Ершов В. С., Золотарев Н. А. и Саляев В. А. 1959. Паразитология и инвазионные болезни сельскохозяйственных животных. М. : 40.

Городович Н. М. 1968. К групповой дегельминтизации крупного рогатого скота при мецистоциррозе. Матер. научн. конфер. ВОГ, ч. 2, М. : 201—205.

Ивашкин В. М. 1948. Мецистоцирроз крупного рогатого скота и меры борьбы с ним. Автореф. канд. дисс. М.

Клочкова В. И. и Выхрестюк Н. П. 1972. Фосфомоноэстеразы у нематоды Mecistocirrus digitatus. «Проблемы паразитологии». Тр. 7-й научн. конфер. паразитологов УССР, ч. I. Киев : 359—360.

Мозгов И. Е. 1954. Фармакология. Руководство для ветеринарных врачей. М. : 523—524.

Сенутайте Я. Ю. 1970. Особенности гликолитических путей у Fasciola hepatica и возможности их блокировки антгельминтными препаратами. Автореф. канд. дисс. Вильнюс.

Шестак Э. А. и Выхрестюк Н. П. 1972. Конечные продукты углеводного обмена нематоды Mecistocirrus digitatus. «Исследования по фауне, систематике и биохимии гельминтов Дальнего Востока». Тр. Биолого-почв. инст. ДВНЦ АН СССР. Владивосток. Новая серия, 11 (114) : 194—198.

Barker S. B. a. Summerson W. H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. J. Biol. Chem., v. 138, 2 : 535—554.

Bossche van den H., Vanparijs O. F. J. a. Thienpont D. 1969. Studies on the carbohydrate metabolism of third-stage Haemonchus contortus larvae. Life Sci., 8 (20) : 1047—1054.

Brand T. von. 1934. Der Stoffwechsel von Ascaris lumbricoides bei oxybiose und anoxybiose. Zeitschr. f. vergl. Physiol., Bd. 2 (220) : 235.

Morris S. 1948. The estimation of glycogen with anthrone reagent. Science, 107 : 254.

Pandya G. T. 1961. Physiological studies on nematodes Setaria cervi. 1. Carbohydrate metabolism. Z. Parasitenkunde, 20 (5) : 466—469.

Savel J. a. Georges P. 1969. Etude de l'influence du regime sur l'etat histologique et physico-chimique du glycogene chez Ascaris lumbricoides. Ann. parasitol. humaine et comparee, 44 (1) : 13—24.

Vierling D. E. (1970. History of phenothiazine. J. Parasitol., v. 5 (4), sect. 2, part 2 : 479.

STUDIES OF INHIBITORY EFFECTS OF PHENOTHIAZINE ON CARBOHYDRATE METABOLISM IN MECISTOCIRRUS DIGITATUS (NEMATODA, RHABDITIDA)

E. A. Shestak

SUMMARY

The presence of phenothiazine in incubation medium of *M. digitatus* exerted the following effects: the increase of glycogene splitting and lactic acid excretion in aerobic conditions; the increase of acetic acid excretion and the decrease of α-methylbutyric acid excretion; glycolysis process inhibition in homogenates and supernatants during incubation with glucose. However, at phenothiazine incubation with FDF glycolysis intensity was unaffected.